

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 85402281.3

(22) Date de dépôt: 20.11.85

(61) Int. Cl.⁴: **C 12 N 15/00**

C 12 P 21/02, A 61 K 39/29
C 12 N 5/00

(30) Priorité: 20.11.84 FR 8417674

(43) Date de publication de la demande:
25.06.86 Bulletin 86/26

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **INSTITUT PASTEUR**
25-28, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cédex 15(FR)

(71) Demandeur: **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)**
15, Quai Anatole France
F-75700 Paris(FR)

(71) Demandeur: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)**
101, rue de Tolbiac
F-75654 Paris Cédex 13(FR)

(72) Inventeur: **Perricaudet, Michel**
6 rue du Renard
F-75004 Paris(FR)

(72) Inventeur: **Tiollais, Pierre**
16 rue de la Glacière
F-75013 Paris(FR)

(72) Inventeur: **Levrero, Massimo**
199 via Alessandria
F-00198 Rome(IT)

(72) Inventeur: **Bailly, Annick**
646 rue de Montmets
F-78630 Orgeval(FR)

(74) Mandataire: **Gutmann, Ernest et al,**
S.C. Ernest Gutmann - Yves Plasseraud 67, boulevard
Hausmann
F-75008 Paris(FR)

(64) **Expression et sécrétion de polypeptides dans des eucaryotes, sous contrôle d'un promoteur d'adénovirus.**

(57) ADN recombinant modifié par une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique déterminée dont l'expression est recherchée, cet ADN recombinant étant approprié à la transformation de lignées cellulaires eucaryotes, notamment humaines ou animales, dont les polymérase endogènes sont susceptibles de reconnaître les promoteurs des adénovirus. L'ADN selon l'invention est plus particulièrement caractérisé par le fait que ladite séquence nucléotidique d'insertion est placée sous le contrôle direct du promoteur précoce de la région E1A du génome d'adénovirus.

EP 0 185 573 A1

BEST AVAILABLE COPY

voir page de garde

ADN recombinant comportant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé sous le contrôle d'un promoteur d'adénovirus, vecteurs contenant cet ADN recombinant, cellules eucaryotes transformées par cet ADN recombinant, produits d'excrétion de ces cellules transformées et leurs applications, notamment à la constitution de vaccins.

L'invention concerne un ADN recombinant comportant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé sous le contrôle d'un promoteur d'adénovirus, des vecteurs contenant cet ADN recombinant et des cellules eucaryotes transformées par cet ADN recombinant, les produits d'excrétion de ces cellules transformées et leurs applications, notamment à la constitution de vaccins.

Les adénovirus humains possèdent un long génome (environ 36.000 pb) linéaire et double brin qui code pour au moins 30 protéines. Le cycle viral, au cours de l'infection de cellules permissives, est divisé en deux phases, précoce et tardive. Il est connu que les quatre régions du génome viral exprimées en phase précoce sont appelées régions E1, E2, E3 et E4, dont les positions respectives dans le génome viral entier sont schématiquement représentées dans la fig. 1. La région E1, située à l'extrémité gauche du génome, est elle-même divisée en deux régions E1A et E1B. Le passage de la phase précoce à la phase tardive, marqué par la répllication du DNA viral, est caractérisé par un changement brutal du programme génétique du virus. L'expression de certains gènes précoces est réprimée alors que la transcription des gènes tardifs s'effectue principalement à partir d'un seul promoteur, le promoteur majeur tardif (fig. 1). De plus, on observe une forte répression de la synthèse des protéines de la cellule hôte (1).

L'organisation génétique des adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad2, Ad5) est suffisamment connue pour que

l'on puisse manipuler leur génome in vitro et son utilisation comme vecteur d'expression d'un gène étranger dans une cellule animale en culture a déjà été envisagée. Il est en effet connu que la région E3, qui représente 6 %
5 du génome, n'est pas essentielle in vitro et peut donc être substituée dans sa totalité (2). La taille du fragment de DNA étranger qu'il est possible d'insérer dans le genome de ces virus est grande. En effet, le virus peut encapsider un génome dont la longueur excède de 5 % celle
10 du genome sauvage.

Différents vecteurs dérivés des adénovirus de type 2 ou 5 ont donc été construits. Dans ces recombinants, le gène étranger était exprimé sous le contrôle du promoteur majeur tardif. Ceci a permis d'obtenir dans certains cas
15 une synthèse de la protéine codée par un gène étranger à un niveau comparable à celui des protéines virales tardives (4, 5, 6, 7). Ceci étant, il résulte de ce qui précède, que l'expression du gène étranger sous le contrôle du promoteur tardif ne peut se manifester que
20 dans la phase tardive du cycle viral.

L'invention découle de la constatation que le promoteur de la région précoce E1A du génome d'un adénovirus (ci-après désigné simplement par "promoteur E1A") pouvait contrôler de façon particulièrement efficace l'expression
25 d'un gène hétérologue (c'est-à-dire étranger vis-à-vis des gènes qui lui sont normalement associés dans l'adénovirus) ou plus généralement d'une séquence nucléotidique hétérologue codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression est recherchée. En d'autres termes, le promoteur
30 E1A se comporte comme un promoteur fort, et ce plus particulièrement lorsque l'ensemble promoteur E1A-séquence codante hétérologue est inséré dans un vecteur viral.

L'invention concerne donc de façon générale un ADN recombinant pour la transformation de lignées cellulaires
35 eucaryotes, notamment humaines ou animales, choisies parmi

celles qui sont infectables par des adénovirus ou dont les polymérases endogènes sont susceptibles de reconnaître les promoteurs des adénovirus, cet ADN recombinant étant en outre modifié par un acide nucléique d'insertion contenant
5 une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites lignées cellulaires est recherchée. Cet ADN recombinant est plus particulièrement caractérisé par le fait que ladite séquence d'insertion est placée sous le contrôle direct du promoteur précoce de la région E1A du génome d'un adénovirus.
10

De préférence, cet ADN recombinant est incorporé dans un vecteur répliquable dans lesdites lignées cellulaires ou associé par recombinaison génétique avec un tel vecteur.

15 S'agissant d'un vecteur viral, notamment de celui dérivé d'un adénovirus, on peut alors également bénéficier de l'avantage s'attachant à la région E1A des adénovirus, à savoir que son expression est constitutive et permanente tout au long du cycle viral (8, 9).

20 Une forme particulière préférée de l'ADN recombinant selon l'invention est caractérisée par le fait qu'elle comporte, en aval de l'acide nucléique d'insertion, dans le sens de la transcription, un génome défectif d'adénovirus comprenant néanmoins l'ensemble de celles des
25 séquences essentielles nécessaires à la répllication de l'adénovirus correspondant, qui sont normalement situées en aval des gènes normalement sous le contrôle direct du promoteur précoce E1A dans ledit génome.

Avantageusement, le génome défectif d'adénovirus
30 avec lequel l'ADN recombinant conforme à l'invention est associé, est constitué par un génome complet d'adénovirus, cependant dépourvu de la partie antérieure de la région E1A du génome viral, notamment de son fragment 0-2,6 % (pourcentage exprimé par rapport à la taille totale du gé-
35 nome de l'adénovirus).

Les ADNs recombinants de l'invention, associés avec des éléments de vecteurs tels que ceux qui ont été mentionnés ci-dessus, constituent en fait des vecteurs contenant lesdits ADNs recombinants. Il sera encore en ce 5 qui les concerne fait référence à des "virus recombinants défectifs", lorsque les éléments de vecteurs associés à l'ADN-recombinant selon l'invention seront dérivés d'un genome défectif d'adenovirus. Ces virus recombinants défectifs sont avantageusement utilisés pour la transfor- 10 mation de lignées cellulaires transformables d'eucaryotes supérieurs (notamment d'origine humaine ou animale) comportant elles-mêmes une séquence distincte de nucléotides apte à compléter la partie du genome de l'adénovirus dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite 15 séquence distincte étant de préférence incorporée au genome des cellules de ladite lignée cellulaire.

A titre d'exemple préféré de telles lignées cellulaires, on mentionnera la lignée 293, lignée de rein embryonnaire humain qui contient, intégrés dans son genome, 20 les onze premiers pourcents de l'extrémité gauche du genome d'un Ad5. Ceux-ci permettent de compléter des virus recombinants défectifs qui portent des délétions de cette région (10).

L'utilisation de ces systèmes vecteur virus défectif recombinant - cellules contenant une séquence capable 25 de compléter les virus recombinants défectifs, est d'un intérêt tout particulier, lorsque la séquence nucléotidique contenue dans l'acide nucléique d'insertion de l'ADN recombinant code pour une protéine qui, lorsqu'elle est 30 exprimée dans un hôte cellulaire naturel sous le contrôle de son promoteur naturel, est excrétée dans le milieu d'une culture de cet hôte cellulaire naturel.

Le gène S du genome du virus de l'hépatite B constitue à cet égard une séquence nucléotidique d'un intérêt 35 particulier, et ce pour plusieurs raisons. D'une part, le

produit d'expression du gène S dans les cellules qui l'expriment, l'HBsAg (11, 12), est secrété dans le surnageant cellulaire sous forme de particules faciles à détecter et à quantifier par dosage radioimmunologique, ce qui permet
5 une évaluation précise de la capacité d'expression du vecteur viral. D'autre part, l'invention fournit un vecteur viral recombinant permettant l'étude de l'expression des gènes de l'HBV tant au niveau de la transcription que de la traduction, ce qui est d'autant plus intéressant qu'il
10 n'existait pas jusqu'à ce jour de système de culture cellulaire capable de propager le virus de l'hépatite B (HBV). Enfin, l'infection cellulaire par le virus recombinant adénovirus-HBV illustre de façon particulièrement
avantageuse la base méthodologique d'un procédé de fabrication d'un vaccin contre un agent pathogène déterminé (en
15 l'occurrence le virus de l'hépatite B dans l'exemple considéré).

Une autre séquence nucléotidique du génome du virus de l'hépatite B d'un intérêt particulier est le gène S
20 muni de sa région pré-S2 qui code pour l'antigène HBs et pour un récepteur de la sérumalbumine humaine polymérisée (pHSA)(25),(26).

Il va de soi que l'on peut substituer dans l'ADN recombinant le gène S par toute autre séquence nucléotidique codant pour un antigène protecteur distinct contre
25 un autre agent pathogène déterminé, surtout lorsque cet antigène protecteur distinct est lui-même normalement susceptible d'être secrété par les cellules transformées par l'ADN recombinant. Il va de soi également que l'on
30 peut substituer dans l'ADN recombinant le gène S et la région pré-S2 par toute autre séquence nucléotidique codant pour un antigène protecteur distinct contre un autre agent pathogène déterminé, surtout lorsque cet
antigène protecteur distinct est lui-même normalement
35 susceptible d'être secrété par les cellules transformées

par l'ADN recombinant. La séquence nucléotidique codant pour cet antigène protecteur distinct peut d'ailleurs éventuellement être insérée dans l'ADN recombinant en phase avec un autre gène, par exemple l'antigène HBsAg, 5 dès lors que cet autre gène peut être utilisé comme "locomotive" pour promouvoir l'excrétion également de cet antigène distinct, notamment sous forme de protéine hybride. Au titre des antigènes distincts susceptibles d'être ainsi produits (le cas échéant sous forme de 10 protéine hybride), on mentionne par exemple des glycoprotéines de structure du virus d'Epstein-Barr.

Les premiers nucléotides de la séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé (protéine "simple" ou hybride) sont placés, notamment par construction 15 aussi près que possible de ce promoteur, notamment de la "boîte TATA" (TATA box), caractéristique du promoteur, étant cependant entendu que la séquence nucléotidique entre le promoteur et l'ATG initiateur de la séquence nucléotidique codant pour ledit polypeptide déterminé devra 20 en général contenir les triplets codant pour l'extrémité 5' non traduite de l'ARN messager correspondant normalement à la séquence codante et contenant les séquences d'appariement aux ribosomes nécessaires à une traduction efficace. Cette extrémité 5' non traduite de l'ARN messager 25 peut d'ailleurs être remplacée par l'extrémité 5' non traduite d'un ARN messager distinct de celui normalement associé à une séquence codante déterminée. Par exemple, on peut, dans le cas du gène S, remplacer l'extrémité 5' non traduite contenant le gène pré-S ou jouxtant 30 celui-ci par l'extrémité 5' non traduite de l'ARN messager de l'antigène T de SV40. Mais on a aussi remarqué que lorsqu'on utilise une séquence d'ADN contenant les régions S et pré-S2 du génome du virus de l'hépatite B sous le contrôle du promoteur fort E1A, il est possible 35 d'obtenir les expressions à la fois de la région pré-S2 et

de la région S.

Toute autre extrémité 5' non traduite d'ARN messenger peut être utilisée, dès lors qu'elle est compatible avec l'autre extrémité similaire choisie.

5 Il est avantageux que la distance entre la boîte TATA du promoteur et le site d'initiation de l'ARN messenger soit d'environ 30 nucléotides.

10 Le promoteur E1A de l'ADN recombinant selon l'invention et encore plus généralement le vecteur selon l'invention mettant en oeuvre des parties plus importantes du génome d'un adénovirus sont de préférence issus d'un adénovirus appartenant à la catégorie C, telle qu'elle a été définie par TOOZE. Ces adénovirus ont la propriété connue de n'être pas oncogènes. Les sous-types Ad2 ou Ad5 de
15 cette catégorie d'adénovirus se caractérisent par un pouvoir transformant important. L'utilisation de ce dernier type d'ADN recombinant est donc particulièrement recommandée, lorsque le produit d'expression recherché est destiné à la production d'antigènes protecteurs, notamment
20 de principes actifs de vaccins. Cela sera encore d'autant plus vrai dans le cas où des adénovirus entiers, et même infectieux, seront utilisés comme principes actifs de vaccins vivants, notamment dans les conditions qui seront encore explicitées plus loin.

25 L'invention concerne naturellement également les lignées cellulaires, notamment d'origine humaine ou animale, qui sont transformées par des ADN recombinants tels que définis ci-dessus et qui ont été rendues capables de synthétiser un polypeptide codé par la séquence nucléotidique (ou lesdites séquences nucléotidiques) contenues
30 dans ces ADNs recombinants et placées sous le contrôle direct dudit promoteur.

L'invention concerne plus particulièrement encore les lignées cellulaires transformées avec un ADN recombinant conforme à l'invention et en outre caractérisées en
35

ce que les cellules de ces lignées cellulaires contiennent elles-mêmes une séquence distincte de nucléotides aptes à compléter la partie du génome de l'adénovirus dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite séquence distincte
5 étant de préférence incorporée au génome des cellules de ladite lignée cellulaire.

A ce titre, la lignée 293 déjà mentionnée plus haut, après avoir été transformée par les ADNs recombinants, constitue une culture cellulaire préférée selon
10 l'invention. Grâce à la séquence de complémentation que contiennent les cellules de cette lignée, on observe une multiplication virale importante à l'intérieur de ces cellules et, par voie de conséquence, une expression également multipliée de la séquence codante pour le
15 polypeptide prédéterminé. Dans le premier cas où cette séquence codante est le gène S, on obtient une production importante d'antigènes HBsAg excrétés dans le milieu de culture de ces cellules. Dans le second cas où les séquences codantes sont constituées par le gène S et la
20 région pré-S2 du virus de l'hépatite B, l'adénovirus recombinant dirige in vitro la synthèse des particules HBsAg possédant une activité de récepteur pour la PHSA. Injecté à des lapins, ce virus recombinant produit des anticorps anti-HBsAg et anti-pHSA. Ceci montre la
25 possibilité d'utiliser un adénovirus recombinant pour exprimer un gène à la fois in vitro et in vivo.

Les mêmes vecteurs peuvent être utilisés pour la transformation de cellules Vero dans des conditions analogues.

30 Les vecteurs contenant l'ADN recombinant selon l'invention peuvent également être utilisés pour la transformation de cellules ne possédant pas elle-même la séquence de complémentation dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus. Il pourra alors être nécessaire
35 de procéder à une co-transformation de ces derniers types

de cellules, d'une part, avec un vecteur contenant l'ADN recombinant selon l'invention, d'autre part, avec un adénovirus non défectif ou un ADN recombinant distinct contenant les séquences d'adénovirus dont est dépourvu le

5 vecteur recombinant conforme à l'invention. Il pourra certes être observé dans ce dernier cas une production simultanée d'antigènes HBsAg (lorsque la séquence codante contient le gène S) et de l'adénovirus répliqué et libéré par les cellules ainsi transformées. L'antigène protecteur

10 formé peut cependant, le cas échéant, être séparé de la suspension virale, par exemple par mise en contact du milieu de culture avec des anticorps anti-adénovirus, de préférence immobilisés sur un support solide, tel que l'agarose réticulée, commercialisée sous la désignation

15 SEPHAROSE. De toute façon, la présence de quantités résiduelles de virus dans la préparation vaccinnante n'est que d'une importance relativement mineure. En effet, l'adénovirus n'a qu'un pouvoir pathogène faible chez l'homme. Il n'entraîne que des infections respiratoires

20 bénignes.

La faible importance du pouvoir pathogène des adénovirus, plus particulièrement de ceux qui appartiennent au groupe C des adénovirus humains, permet d'envisager la constitution de "vaccins vivants". Ceux-ci peuvent être

25 constitués par des adénovirus infectieux modifiés au niveau de la région E3 par l'insertion de l'ADN recombinant selon l'invention dans la partie non essentielle de l'adénovirus. A cet égard, il faut souligner le fait que les adénovirus humains du groupe C ne se sont jamais révélés

30 tumorigènes chez l'animal (3). Ces vecteurs ou virus seront d'un intérêt tout particulier pour la transformation de cellules Vero, dont le caractère non tumorigène est maintenant solidement établi. De ce fait elles constituent une lignée d'origine animale particulièrement

35 favorable à la production de produits à usage humain.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit de constructions préférées de vecteurs contenant l'ADN recombinant selon l'invention et des conditions dans lesquelles ces vecteurs sont utilisables. Il sera fait référence à cette occasion aux dessins dans lesquels :

- la fig. 1 représente schématiquement les positions relatives des différentes régions du génome d'un adénovirus du sous-type Ad5, d'une part, et à échelle agrandie, de la région E1A de ce génome ;

- la fig. 2 est un schéma désormais classique du génome du virus de l'hépatite B ;

- les fig. 3 à 6 montrent les constructions successives qui ont conduit à la réalisation d'un plasmide contenant un premier ADN recombinant conforme à l'invention (fig. 6) et

- la fig. 7 représente schématiquement la construction d'un "virus recombinant défectif" à partir du plasmide modifié de la fig. 5 et de génomes défectifs de Ad5.

On fera d'abord les observations suivantes à propos des figures, avant de décrire la réalisation de constructions d'ADNs recombinants selon l'invention.

Dans les fig. 3 à 6, les parties en trait fin correspondent à des séquences du plasmide pML2.

Les nombres apparaissant dans les fig. 1 à 5 indiquent les positions des sites de restriction dans les séquences virales Ad5, SV40 et HBV. Les numérotations des positions des sites de restriction de Ad5 et du SV40 sont celles de J. TOOZE (1), celles de l'HBV sont celles de P. TIOLLAIS et al. (11).

Les raturations des désignations de sites dans les dessins témoignent de la présence antérieure des mêmes sites dans les parties correspondantes des ADNs qui seront décrits ci-après. Ces sites ont cependant été délévés, supprimés par réparation des extrémités cohésives des

fragments ouverts ou fragmentés à l'aide des enzymes de restriction correspondantes, ou par tout autre moyen tel qu'envisagé dans la description qui suit des constructions qui ont été faites.

5 1. Rappel des principaux éléments de la structure et de l'organisation du génome de l'adénovirus Ad5 (ci-après souvent simplement désigné par la désignation Ad5) :

Ils résultent des parties 1A et 1B de la fig. 1.

10 1A : Le génome est une molécule de DNA linéaire double brin longue d'environ 36.000 pb. Les flèches indiquent la position et le sens des transcriptions des régions précoces E1a, E1b, E2, E3 et E4. Le promoteur majeur tardif PM_t et l'unité de transcription qui lui est associée sont également montrés. Les numérotations de 10 en 10, de 0 à 100, correspondent à des tailles exprimées en % de la taille du génome total.

20 1B : La région E1A. Les transcripts de cette région ont tous des extrémités 5'P (position 499) et 3'OH (position 1632) identiques. Le premier T de l'élément TATA du promoteur est situé à la position 468. Les sites de restriction utilisés dans les constructions des plasmides sont indiqués. Les tailles sont exprimées par des nombres de paires de bases.

25 2. Origine des fragments contenant le gène S ou le gène S et la région pré-S2 utilisés dans les constructions qui suivent.

1° cas : Fragment du génome du virus de l'hépatite B contenant le gène S.

30 Il est issu du génome du virus de l'hépatite B (fig. 2). Il est rappelé que le génome du virus de l'hépatite B est une molécule de DNA circulaire partiellement simple brin. Sa longueur est d'environ 3.200 pb. Il est constitué par l'appariement de deux brins de longueur inégale appelés brins L(-) et S(+). Le gène S
35 représente la séquence codante du polypeptide majeur de

l'enveloppe virale qui porte l'HBsAg. Le fragment d'ADN utilisé dans les constructions ci-après est le fragment XhoI₁₂₇-BglII₁₉₈₄. Le site de polyadénylation du messager de l'HBsAg a été localisé à la position 1916.

- 5 2° cas : Fragment du génome du virus de l'hépatite B contenant le gène S et la région pré-S2.

Le fragment d'ADN utilisé est le fragment MstII₃₁₆₁-BglII₁₉₈₂ qui code à la fois pour l'antigène HBs et pour un récepteur de la sérumalbumine humaine polymérisée (pHSA). Le site MstII précède le codon
10 d'initiation de la région pré-S2 de 9 nucléotides. Le site BglII est situé à 64 nucléotides en aval du signal de poly A addition du gène S (de l'anglais "poly A addition signal").

- 15 Il est question dans ce qui suit de la construction et de la propagation d'un adénovirus recombinant comportant le gène S. Le mode opératoire est identique pour obtenir un adénovirus recombinant, conforme à l'invention, possédant le gène S et la région pré-S2,
20 étant entendu que, dans ce second cas, c'est le fragment d'ADN MstII-BglII qui est inséré entre les sites de restriction HindIII et BamHI du plasmide pK4, à la place du fragment d'ADN XhoI-BglII dont il est question ci-après.

- 25 On désignera dans ce qui suit par Ad5(X-B) l'adénovirus recombinant possédant le gène S et par Ad5(M-B) l'adénovirus recombinant possédant le gène S et la région pré-S2.

3. Construction du plasmide pE1A(TaqI) (fig. 3).

- 30 Le plasmide pE1A(TaqI) contient les 632 premiers nucléotides de l'extrémité gauche du génome de l'Ad5. Ce fragment a été obtenu par coupure du fragment de restriction purifié SacI E (0 - 5,0 %) de l'Ad5 par TaqI (fig. 1). Ce fragment a été inséré entre les sites de res-
35 triction EcoRI et ClaI du plasmide pML2 (fig. 3) Le

plasme pML2 a été ouvert par EcoRI et ClaI. Le fragment de Ad5 a été lié au plasmide linéarisé au niveau de l'extrémité TaqI. La jonction des extrémités TaqI-ClaI recrée un site de restriction ClaI. L'extrémité EcoRI du recombinaut a été réparée avec la DNA-polymérase I de *E. coli* (fragment de Klenow) et le plasmide recircularisé au moyen de la ligase T4. Le site EcoRI a donc été reconstitué.

4. Fabrication du plasmide pAB1 (fig. 4).

Le plasmide pAB1 a été construit à partir du plasmide pE1A(TaqI), de façon à éliminer la partie codante de la région E1A. Ceci a été effectué par isolement du fragment PvuII-PvuII (positions 452-623), coupure de ce fragment par l'enzyme HaeIII (position 495), réinsertion du fragment PvuII₄₅₂-HaeIII₄₉₅ au niveau du site PvuII₆₂₃ du plasmide pE1A(TaqI). En d'autres termes, le fragment HaeIII₄₉₅-Pvu₆₂₃ a été délété. Le plasmide pAB1 contient un site HindIII proche du site d'initiation de transcription de la région E1A et un site BamHI (de pML2) situé à distance. Ces deux sites de restriction peuvent être utilisés pour cloner des gènes étrangers sans qu'il y ait fusion génétique.

5. Production du plasmide pK4 (fig. 5).

pAB1 a été coupé par HindIII et BamHI et le fragment contenant le promoteur de E1A, issu de pAB1, a été lié, au niveau de son extrémité BamHI au fragment BglI-BamHI (positions 5235-2533 du génome du virus SV40)

30

35

ci-après dénommé A(SV40) contenant le gène codant pour les antigènes T et t du virus SV40. Après réparation des extrémités BglII et HindIII du reconstituant par le fragment de Kleenow, le plasmide est recircularisé au moyen de la ligase T4. La construction présente dans le plasmide pK4 a été testée en mettant en jeu l'expression transitoire du gène T. Introduit dans des cellules HeLa par transfection selon la technique au phosphate de calcium (19), le plasmide pK4 dirige la synthèse de l'antigène T de SV40 qui a été détectée par immunofluorescence. Environ 1 % des cellules transfectées présentaient une fluorescence nette. L'absence de fluorescence après transfection cellulaire par un plasmide contenant le fragment de SV40 inséré dans la mauvaise orientation montre que le gène des antigènes T et t est bien placé sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad5.

C'est le site HindIII, à la position 5171 du fragment A(SV40) qui est ensuite utilisé pour substituer le susdit fragment contenant le gène S à la majeure partie de A(SV40).

6. Production du plasmide pK4S (X-B)(fig. 6).

Le plasmide pK4 a été digéré par HindIII et BamHI. Le fragment XhoI-BglII (positions 125 à 1982) du génome du virus de l'hépatite B (HBV) (fig. 2) a été inséré, en lieu et place de la majeure partie de A(SV40) entre les sites de restriction HindIII et BamHI du plasmide pK4, après réparation de leurs extrémités respectives par la DNA polymérase I d'*E. coli* (fragment de Kleenow) (fig. 3). Les sites de restriction XhoI, HindIII, BamHI et BglII sont perdus après ligature.

Le site HindIII était situé à 8 nucléotides en amont de l'ATG initiateur des antigènes T et t. L'insertion du gène S dans ce site permet donc de conserver l'extrémité 5' du mRNA précoce de SV40 contenant le site de "capping" et les séquences d'appariement du messager aux

ribosomes. Le fragment de DNA HBV contient la séquence codante ou gène S (position 155 à 833) du polypeptide majeur de l'enveloppe virale porteur de l'HBsAg ainsi que la séquence située en 3' du gène S et qui inclut le site de polyadénylation de l'ARN messager de l'HBsAg à la position 1916 (20, 21, 22). Deux plasmides pK4S⁺ et pK4S⁻ porteurs du fragment HBV inséré dans les deux sens ont été isolés. Des cellules 293 ont été transfectées par ces deux plasmides et la synthèse d'HBsAg a été recherchée dans le surnageant cellulaire 3 jours après la transfection. Seul le plasmide pK4S⁺ qui possède le promoteur E1A à l'extrémité 5' du gène S est capable de diriger la synthèse d'HBsAg. Ceci montre que l'expression du gène S est bien sous le contrôle du promoteur E1A de l'Ad5. Finalement, un site de restriction ClaI non méthylé dans *E. coli* a été introduit dans le plasmide pK4S⁺ (X-B) au niveau du site NruI de la séquence pML₂. Le site est nécessaire à la construction du virus recombinant.

C'est finalement le fragment délimité par des extrémités PstI et ClaI, et obtenu à partir de pK4S⁺ (X-B), qui a été utilisé pour la fabrication d'un "virus recombinant défectif" conforme à l'invention.

7. Construction du virus recombinant défectif (fig. 7).

3 microgrammes du fragment de restriction PstI-ClaI purifié à partir du plasmide pK4S⁺ (X-B) ont été ligaturés à 20 microgrammes du fragment de restriction ClaI (2,6 % - 100 %) de l'Ad5 purifié par ultracentrifugation en gradient de saccharose pour fournir le "virus défectif recombinant" Ad5.

8. Propagation du virus recombinant.

Les cellules 293 ont été cultivées dans des boîtes de 6 cm de diamètre. 4 heures avant la transfection le surnageant de culture a été remplacé par du milieu. 5 boîtes de cellules 293 à 70 % de confluence ont alors été transfectées avec le mélange de ligation selon la

technique au phosphate de calcium puis incubées pendant 4 heures à 37°C. Après adsorption, les cellules contenues dans chaque boîte ont été lavées avec 2 ml de tampon TS (NaCl 8000,0 mg/l, KCl 380,0 mg/l, Na₂ HPO₄ 100,0 mg/l, CaCl₂ 100,0 mg/l, MgCl₂ 6H₂O 100,0 mg/l, Tris 3000,0 mg/l pH 7,4), traitées avec 400 microlitres d'une solution TS contenant 20 % de glycérol pendant 1 minute à température ordinaire, lavées deux fois avec 2 ml de tampon TS, puis recouverte avec 4 ml de milieu MEM contenant 1 % d'agar noble, 1 % de sérum de veau foetal. Aux jours 4 et 7, les cellules ont été recouvertes avec 4 ml du mélange nutritif. Aujourd'hui 10, les cellules ont été colorées avec 4 ml du milieu nutritif supplémenté avec 0,01 % de rouge neutre. Les plages ont été observées au jour 11. Les virus ont été resuspendus dans 1 ml de TS et amplifiés sur cellules 293. La présence de HBsAg dans le milieu de culture a été testée par RIA (Austria II, laboratoire ABBOTT). Après amplification, la présence de séquences HBV dans le recombinant a été testée par hybridation. Cinq plages ont été analysées. Une seule contenait un virus recombinant HBsAg⁺. Ce clone Ad5(X-B) ainsi qu'un autre clone étaient positifs pour la détection de séquences HBV. La taille du génome viral recombinant excède celle du virus sauvage de 2100 pb. Aucune délétion n'a pu être détectée par analyse de fragments de restriction du génome recombinant. Par ailleurs, cette analyse a montré que les séquences du pML2 situées entre le site de restriction PstI et la séquence d'Ad5 ont été correctement excisées au cours de la propagation du génome recombinant dans la lignée 293.

9. La synthèse d'HBsAg dirigée par le vecteur Ad5(X-B).

Des cellules 293 et des cellules Vero ont été infectées par le virus Ad5(X-B). Les niveaux d'expression de HBsAg synthétisé sont montrés dans le tableau I. Des

échantillons du surnageant cellulaire ont été prélevés 3 jours après l'infection et l'HBsAg a été recherché par essai radioimmunologique ("radio-immunoassay : RIA). Les résultats montrent que le vecteur Ad5(X-B) est capable de
5 diriger la synthèse d'HBsAg dans ces deux lignées cellulaires, et l'excrétion d'HBsAg par les lignées cellulaires dans leurs milieux de culture respectifs.

L'HBsAg synthétisé a été purifié par ultracentrifugation en CsCl. Il a une densité de 1,20. Des particules
10 typiques de 22 nm ont été observées par microscopie électronique.

10. Synthèse d'HBsAg dirigée par les vecteurs Ad5(M-B).

Les niveaux d'expression de l'HBsAg synthétisé après l'infection de cellules 293 et de cellules Vero par
15 Ad5(M-B) sont montrés dans le tableau I.

La cinétique de la distribution extra- et intracellulaire de HBsAg à partir de cellules Vero infectées par Ad5(M-B) a indiqué que la synthèse d'HBsAg a commencé 3 heures après l'infection et a pu être détectée dans le
20 milieu après 8 heures. L'infection par le virus recombinant Ad5(M-B) a conduit à une accumulation de HBsAg de 0,5 à 1 $\mu\text{g}/10^6$ cellules dans le milieu après 120 heures. Des expériences répétées ont montré que le virus recombinant contenant la région pré-S2 synthétise de plus
25 grandes quantités de HBsAg que le virus recombinant ne contenant que le gène S. L'HBsAg purifiée à partir du milieu de culture de cellules infectées par l'adénovirus recombinant Ad5(M-B) a consisté en une population homogène de particules ayant un diamètre moyen de 22 nm. La densité
30 après centrifugation en CsCl a été de 1,21.

11. Activité de récepteur pour la pHSA des particules HBsAg issues de cellules Vero.

Les particules HBsAg produites dans les cellules Vero ont été testées par la technique d'hémagglutination
35 de globules rouges de moutons recouverts de pHSA et par

essai radioimmunologique (RIA) pour déceler la présence d'une activité de récepteur pour la pHSa. Une activité de fixation pour la pHSa a été détectée, mais pas pour l'albumine bovine polymérisée (tableau II). Une telle
5 activité n'a pas été décelée avec les cellules Vero infectées par l'adénovirus recombinant Ad5(X-B) contenant seulement le gène S.

12. Activité in vivo du virus recombinant.

Des lapins ont été inoculés intraveineusement avec
10 des préparations hautement purifiées de l'adénovirus recombinant Ad5(M-B) et de l'adénovirus sauvage. Bien que l'antigène HBsAg n'ait pu être détecté dans leur sérum, 5 lapins sur 8, inoculés avec le virus recombinant, ont montré l'apparition d'un titre anti-HBs variant de 20 à
15 270 mIU/ml après 15 jours (tableau III). Aucun anticorps anti-HBs n'a été détecté dans les lapins auxquels on a injecté le type sauvage d'adénovirus. Après une seconde inoculation intraveineuse réalisée 4 semaines après la première, un second pic a été observé dans la réponse
20 anti-HBs atteignant 440 mIU/ml pour l'un des animaux. 4 semaines après la seconde injection, des titres d'anti-HBs variant de 6 mIU/ml à 360 mIU/ml étaient relevés. Des études antérieures ont indiqué que le niveau minimum d'anti-HBs encore protecteur contre l'HBV est de 10 mIU/ml
25 pour l'homme. Les anticorps anti-pHSa ont été recherchés chez les lapins inoculés dans le but de déterminer leur rapport avec la neutralisation de l'HBV. Ces anticorps, détectés par l'inhibition de l'hémagglutination, ont été trouvés dans 5 animaux sur 5 ayant une réponse anti-HBs
30 positive (tableau IV).

L'adénovirus recombinant Ad5(M-B) dirige donc in vivo la synthèse de particules HBsAg ayant un caractère récepteur pour la sérumalbumine humaine polymérisée.

L'invention fournit donc une base méthodologique
35 pour la fabrication d'un vaccin contre l'hépatite B (ou

contre d'autres types d'affections) dans des cultures cellulaires.

L'intérêt de l'utilisation de l'adénovirus de type 5 comme vecteur est double. D'une part, ce virus est un virus dont le pouvoir pathogène chez l'homme est faible. Il n'entraîne que des infections respiratoires bénignes. D'autre part, ce sérotype qui appartient au groupe C des adénovirus humains n'est pas tumorigène chez l'animal. D'autre part, le taux de production d'HBsAg obtenu sur cellules Vero (environ 1 microgramme/ 10^6 /par cycle infectieux) est a priori suffisant pour une exploitation industrielle. Or cette lignée cellulaire est non tumorigène et pour cette raison, elle constitue la lignée d'origine animale a priori la plus favorable à la production d'un produit à usage humain.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes ; parmi ces variantes, il y a lieu de mentionner les autres formes de vecteurs contenant l'ADN recombinant selon l'invention, notamment des plasmides. Ceux-ci peuvent être, soit utilisés pour fabriquer des vecteurs viraux du genre de ceux qui ont été décrits, soit être utilisés eux-mêmes en tant que véhicules d'incorporation de l'ADN recombinant dans le génome des cellules d'eucaryotes supérieurs, notamment des cultures de cellules humaines ou de primates.

Il va également de soi que peuvent être substitués aux cellules 293 qui ont été mentionnées plus haut toutes autres cellules d'eucaryotes supérieurs infectables par des adénovirus ou susceptibles de reconnaître le promoteur E1A des adénovirus, ces cellules ayant été modifiées, par incorporation au préalable dans leurs propres génomes, d'une séquence contenant les parties manquantes au virus

recombinant défectif selon l'invention du génome d'un
adénovirus, notamment sous le contrôle d'un promoteur
fort reconnu par ces cellules, par exemple d'un promoteur
de la thymidine kinase ou d'un promoteur de virus SV40. La
5 séquence originaire de l'adénovirus, alors intégrée dans
le génome de ces cellules d'eucaryotes supérieurs, pourra
donc compléter les virus défectifs conformes à
l'invention, dans des conditions analogues à celles per-
mises par les cellules 293. Ces méthodes sont applicables
10 avec un avantage particulier à des cellules Vero.

L'adénovirus Ad5 mis en oeuvre a été déposé le
3 août 1984 sous le n° I-322 à la C.N.C.M. ("Collection
Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'INSTITUT
PASTEUR de Paris.

15 La lignée 293 a été déposée à la C.N.C.M. le
3 août 1984 sous le n° I-323.

20

25

30

35

TABLEAU IProduction de HBsAg extracellulaire en fonction du temps

5	Jour	Ad5(X-B)	Ad5(X-B)	Ad5(M-B)	Ad5(M-B)
		Cellules Vero infectées	Cellules 293 infectées	Cellules Vero infectées	Cellules 293 infectées
10	1	13	15	106	35
	2	17	90	N.D.	N.D.
	3	45	110	349	56
	4	110	100	668	60
	5	320	130	1 057	63
	6	470	120	1 153	N.D.
15	7	550	120	900	N.D.

Les quantités cumulatives de HBsAg (en ng) produites après infection de cellules 293 et de cellules Vero, soit par Ad5(X-B), soit par Ad5(M-B) sont indiquées.

25

30

35

TABLEAU II

Activité de récepteur pour la pHSA des particules HBsAg
à partir de cellules Vero.

	Surnageant de culture de cellules						Sérum humain				
5	Ad5(X-B)		Ad5(M-B)		Témoin non infecté		HBsAg+ HBeAg+		Témoin sain		
10	RIA		HA		RIA		HA		RIA		
	pHSA	143	-	7 512	64	119	-	10 472	128	65	-
	pBSA	58	ND	85	ND	77	ND	145	ND	81	ND

Les résultats sont exprimés en cpm pour l'essai radioimmunologique en phase solide et en titre d'héماغglutination (HA).

ND, non déterminé.

- 20 pHSA : sérumalbumine humaine polymérisée.
 pHSA : sérumalbumine bovine polymérisée.
 cpm : (counts per minute).

25

30

35

TABLEAU III

Réponse anti-HBs (mIU ml^{-1}) chez les lapins inoculés.

Semai- 5 nes	L a p i n s									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	2	0	0	30	8	6	12
	2	2	0	2	0	2	15	20	270	70
10	3	0	2	0	0	5	18	13	48	15
	4	1	0	0	0	2	21	15	27	17
	5	0	0	2	0	2	99	52	440	146
	6	0	0	0	0	0	78	26	401	151
	7	0	0	0	0	0	20	27	325	58
15	8	0	0	0	0	0	20	40	367	35
										6

On a fait une injection intraveineuse de 10^9 pfu de l'adénovirus Ad5 sauvage purifié à des lapins (lapins 1 et 2) et 10^9 pfu d'adénovirus recombinant Ad5(M-B) purifié à des lapins (lapins 3 à 10) immédiatement après le prélèvement du sang à la semaine 0 et à la semaine 4. La quantité d'anticorps anti-HBs a été mesurée en utilisant le système RIA AUSAB de Abbott et exprimée en unités internationales (3,5 RIA équivalant à 1 mIU).

(pfu = plaque formant unité).

TABLEAU IV

Réponse immunogène du récepteur anti-pHSA (réciproque du titre).

5	L a p i n s					
	Semai- nes	6	7	8	9	10
10	0	0	0	0	0	0
	1	16	2	2	2	2
	2	4	16	16	16	16
	3	4	4	16	8	8
	4	2	2	4	4	4
15	5	16	32	32	32	32
	6	16	32	32	16	32
	7	8	8	32	8	16
	8	4	4	8	4	8

On a infecté, d'une manière intraveineuse, des
 20 lapins avec 10^9 pfu d'adénovirus recombinant Ad5(M-B)
 purifiés aux semaines 0 et 4. Les animaux ont été
 identifiés par les mêmes numéros que dans le tableau
 III.

L'activité de récepteur anti-pHSA a été exprimée
 25 comme la réciproque du titre de sérum le plus élevé ca-
 pable de fournir une inhibition à 100 % de l'hémaggluti-
 nation. Les particules d'HBsAg possédant un titre
 d'hémagglutination récepteur pour la pHSA de 1:128 ont
 été mélangées avec un volume égal de dilutions en séries
 30 de sérums inhibiteurs.

REFERENCES

- (1) Edited by Tooze, DNA Tumor Viruses (part II), Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
- (2) Berkner, K. and Sharp, P. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 6003-6020.
- (3) Jones, N. and Shenk, T. (1978) Cell 13, 181-188.
- (4) Solnick, D. (1983) The Embo Journal 2, 845-851.
- (5) Thummel, C., Tjian, R. and Grodzicker, T. (1981) Cell 23, 825-836.
- (6) Berkner, K. and Sharp, P. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 1925-1941.
- (7) Thummel, C., Tjian, R., Shiu-Lok Hu and Grodzicker, T. (1983) Cell 33, 455-464.
- (8) Spector, D., McGrogan, M. and Raskas, H. (1978) J. Mol. Biol. 126, 395-414.
- (9) Shan, A. R. and Ziff, E. B. (1980) Cell 22, 905-916.
- (10) Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) J. Gen. Virol. 36, 59-72.
- (11) Tiollais, P., Charnay, P. and Vyas, G. (1981) Science 213, 406-411.
- (12) Peterson, D.L. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6975-6983.
- (13) Lusky, M. and Botchan, M. (1981) Nature 293, 79-81.
- (14) Enns, R., Challberg, M., Ahern, K., Chow, K., Mathews, C., Astell, R. and Pearson, G. (1983) Gene, 23, 307-313.
- (15) Tibbetts, C. (1977) Cell 12, 243-249.
- (16) Hammar-skjöld, M.L. and Winberg, G. (1980) Cell 20, 787-795.
- (17) Stow, N. (1981) J. Virol. 37, 171-180.

- (18) D'Halluin, J.C., Milleville, M. and Boulanger, P.
(1983) *Gene* 21, 165-169.
- (19) Graham, F.L. and Van Der Eb, A.J. (1973) *Virology*
52,
5 456-467.
- (20) Charnay, P., Mandart, E., Hampe, A., Fitoussi, F.,
Tiollais, P., and Galibert, F. (1979) *Nucl. Acids*
Res. 7, 335-346.
- (21) Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M., Zaldivar,
10 J.,
Goodman, H.M., Rotter, W.J. (1979) *Nature* 280, 815-
819.
- (22) Pourcel, C., Louise, A., Gervais, M., Chensiner,
N.,
15 Dubois, M.F., Tiollais, P. (1982), *J. Virol.* 42,
100-
105.
- (23) Stenlund, A., Lamy, D., Moreno-Lopez, S., Ahola,
H.,
20 Petterson, U. and Tiollais, P. (1982) *EMBO J* 2, 669-
673.
- (24) Moriarty, A.M., Hoyer, B.H., Shih, J.W.K., Guérin,
J.L. and Hamer, D.H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
78, 2606-2610.
- 25 (25) Heermann, K.H., Goldmann, V., Schwartz, W.,
Seyffarth, T., Baumgarten, H., et Gerlich, W.H.
J. Virol. 52, 396-402, 1984.
- (26) Standring, D.N., Rutter, W.J., Varmus, H.E., et
Ganem, D. *J. Virol.* 50, 563-571, 1984.

30

35

REVENDICATIONS

- 1 - ADN recombinant pour la transformation de lignées cellulaires eucaryotes, notamment humaines ou animales, choisies parmi celles qui sont infectables par des adénovirus ou dont les polymérases endogènes sont susceptibles de reconnaître les promoteurs des adénovirus, cet ADN recombinant étant en outre modifié par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites lignées cellulaires est recherchée, caractérisé par le fait que ladite séquence d'insertion est placée sous le contrôle direct du promoteur précoce de la région E1A du génome d'un adénovirus.
- 2 - ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est incorporé dans un vecteur replicable dans lesdites lignées cellulaires ou associé par recombinaison génétique avec un tel vecteur.
- 3 - ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte en aval de l'acide nucléique d'insertion un génome défectif d'adénovirus comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à la répllication de l'adénovirus correspondant, qui sont normalement situées en aval des genes normalement sous le contrôle direct du promoteur précoce E1A dans ledit génome.
- 4 - ADN recombinant selon la revendication 3, caractérise en ce que le génome de l'adénovirus avec lequel il est associé est défectif, en ce qu'il est dépourvu de la partie antérieure de la région E1A du génome viral, notamment de son fragment 0-2,6 %.
- 5 - ADN recombinant selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est incorporé dans une région non essentielle d'un adénovirus, notamment dans la partie non essentielle de la région E3 de cet

adénovirus.

6 - ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que son promoteur est originaire d'un adénovirus de catégorie C, appartenant au sous-type Ad2 ou Ad5.

7 - ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique contenue dans le susdit acide nucléique d'insertion code pour une protéine qui, lorsqu'elle est exprimée dans un hôte cellulaire naturel sous le contrôle de son promoteur naturel, est excrétée dans le milieu d'une culture de cet hôte cellulaire naturel.

8 - ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la susdite séquence nucléotidique code pour un antigène protecteur contre un agent pathogène déterminé, notamment pour l'antigène HBsAg.

9 - Lignée cellulaire d'origine humaine ou animale, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un ADN-recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, et en ce qu'elle synthétise le polypeptide codé par la susdite séquence nucléotidique.

10 - Lignée cellulaire selon la revendication 9 considérée en combinaison avec la revendication 3 ou la revendication 4, ou les deux à la fois, et, le cas échéant, avec l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle contient elle-même une séquence distincte de nucléotides apte à compléter la partie du genome de l'adénovirus dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite séquence distincte étant de préférence incorporée au genome des cellules de ladite lignée cellulaire.

11 - Procédé de production d'un polypeptide déterminé comprenant la transformation par un ADN recombinant contenant une séquence nucléotidique codant

- pour ledit polypeptide d'une lignée de cellules eucaryotes, notamment animale ou humaine, choisie parmi celles qui sont infectables par des adénovirus ou dont les polymérases endogènes sont aptes à reconnaître les promoteurs des adénovirus, caractérisé par le fait que l'ADN transformant est conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 8 et en ce que l'on recueille les produits d'expression de ces cellules, y inclus ledit polypeptide déterminé.
- 10 12 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'ADN recombinant est conforme à l'une quelconque des revendications 4 à 6.
- 13 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le fait que les cellules eucaryotes transformées sont conformes à la revendication 10.
- 15 14 - Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le fait que les susdites cellules eucaryotes sont simultanément transformées avec l'adénovirus infectieux correspondant.
- 20 15 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique déterminée est conforme à celle définie dans la revendication 7.
16. Procédé de production d'un polypeptide possédant des propriétés immunogènes caractéristiques du virus de l'hépatite B comprenant la transformation d'une lignée de cellules eucaryotes, notamment animales ou humaines, choisie parmi celles qui sont infectables par des adénovirus ou dont les polymérases endogènes sont aptes à reconnaître les promoteurs des adénovirus, par un ADN recombinant contenant un insérat comprenant lui-même une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide immunogène caractéristique du virus de l'hépatite B, caractérisé en ce que la susdite séquence nucléotidique est placée dans cet ADN recombinant sous le contrôle
- 25
- 30
- 35

direct du promoteur précoce de la région E1A du génome d'un adénovirus.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'ADN recombinant est incorporé
5 dans un vecteur consistant en un adénovirus défectif répliquable dans lesdites lignées de cellules, ledit adénovirus étant dépourvu de la partie antérieure de la région E1A du génome viral, notamment de son fragment 0-2,6 %, mais comportant néanmoins l'ensemble des
10 séquences essentielles à la réplication de l'adénovirus correspondant, qui sont normalement situées en aval des gènes normalement sous le contrôle direct du promoteur précoce E1A dans ledit génome, et en ce qu'on recueille dans le milieu de culture les produits d'expression des
15 lignées de cellules eucaryotes transformées par l'ADN recombinant, y inclus le polypeptide codé par la susdite séquence nucléotidique et synthétisé par lesdites lignées de cellules.

18. Procédé selon les revendications 16 ou 17, caractérisé en ce que le promoteur de l'ADN recombinant
20 est originaire d'un adénovirus de catégorie C, appartenant au sous-type Ad2 ou Ad5.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce que l'ADN
25 recombinant est incorporé dans une région non essentielle de l'adénovirus, notamment dans la partie non essentielle de la région E3 de cet adénovirus.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que la lignée
30 de cellules eucaryotes contient elle-même une séquence distincte de nucléotides aptes à compléter la partie du génome de l'adénovirus dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite séquence étant de préférence incorporée au génome des cellules de ladite lignée de cellules.

35 21. Procédé selon l'une quelconque des

revendications 16 à 20, caractérisé en ce que l'ADN recombinant comprend la séquence nucléotidique codant pour le gène S du génome du virus de l'hépatite B.

22. Procédé selon l'une quelconque des 5 revendications 16 à 20, caractérisé en ce que l'ADN recombinant comprend la séquence codant pour le gène S et la région pré-S2 du génome du virus de l'hépatite B.

23. Composition de vaccin contenant les produits excretés ou libérés dans le milieu par les cellules 10 eucaryotes transformées par le procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, en tant que principe actif d'un vaccin actif contre un agent pathogène, notamment contre le virus de l'hépatite B.

15

20

25

30

35

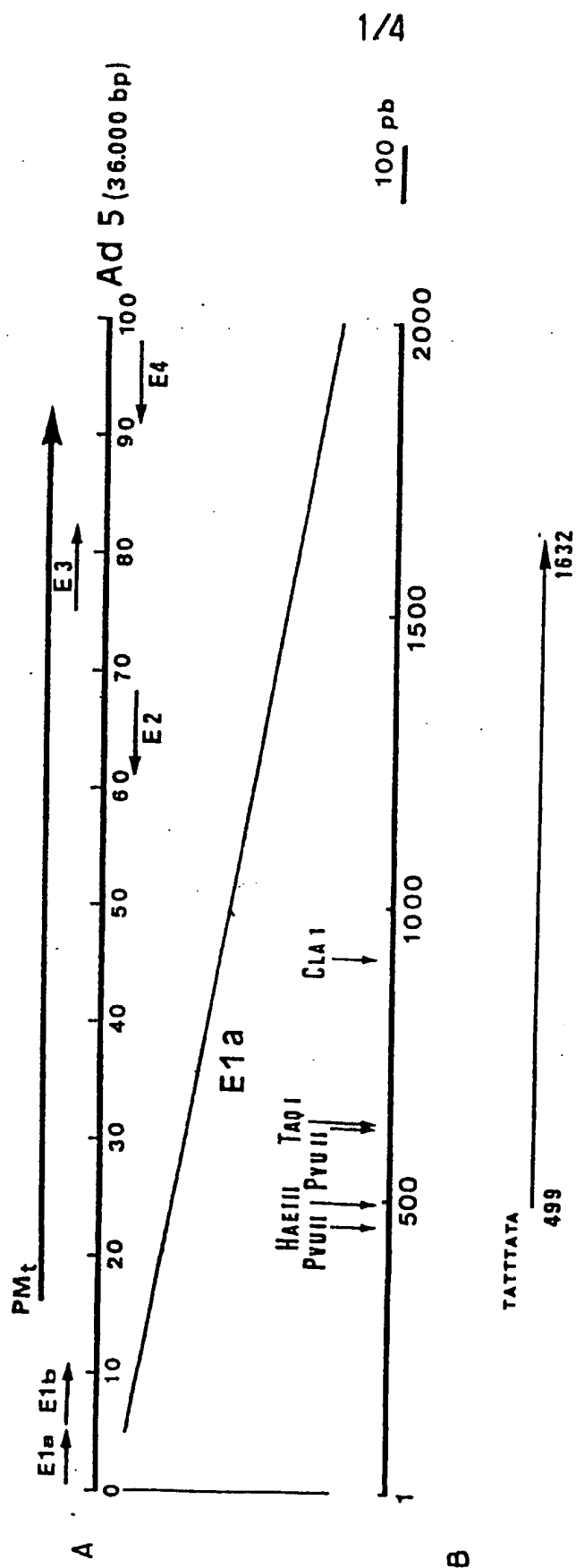


FIG.1.

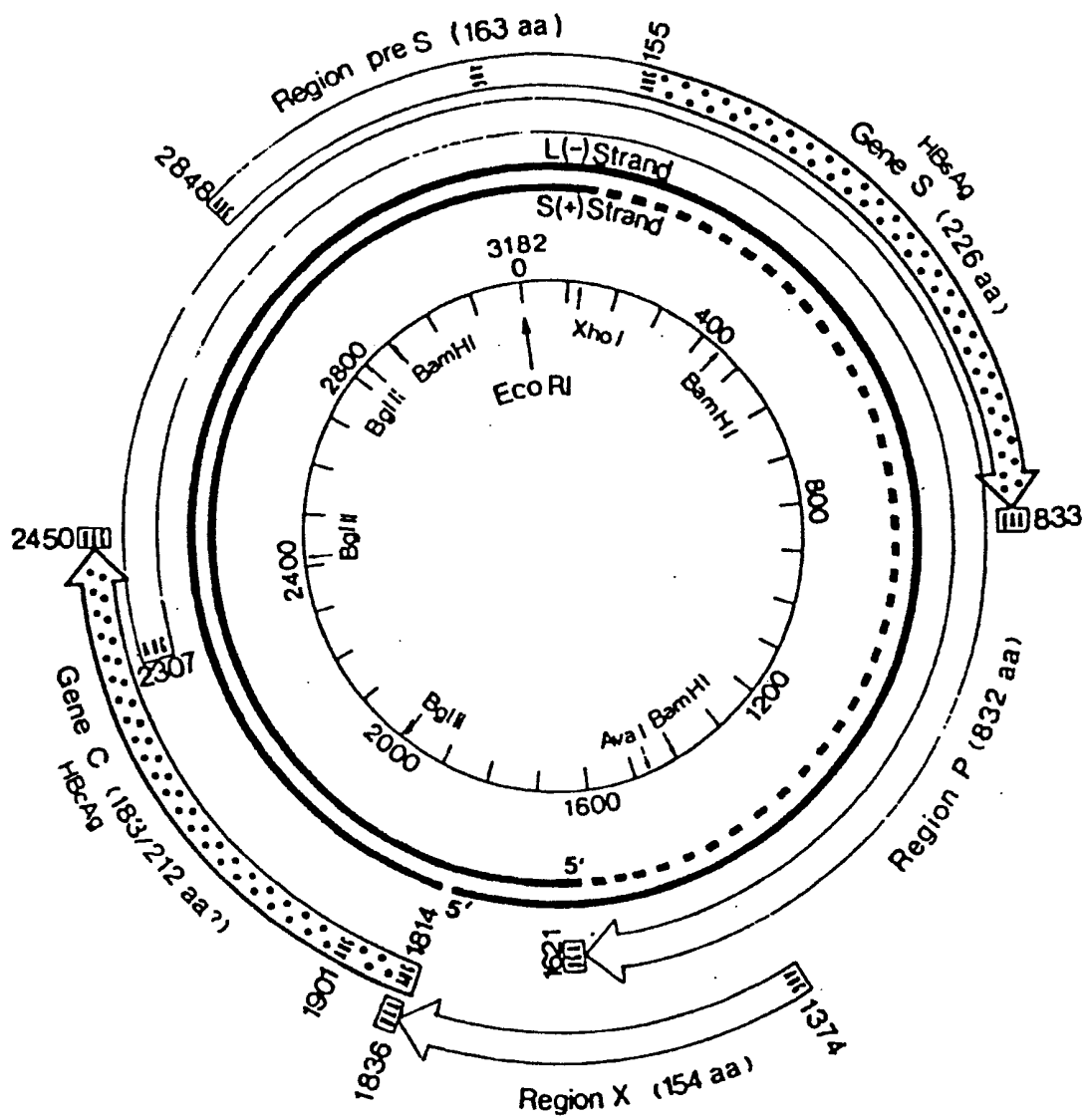
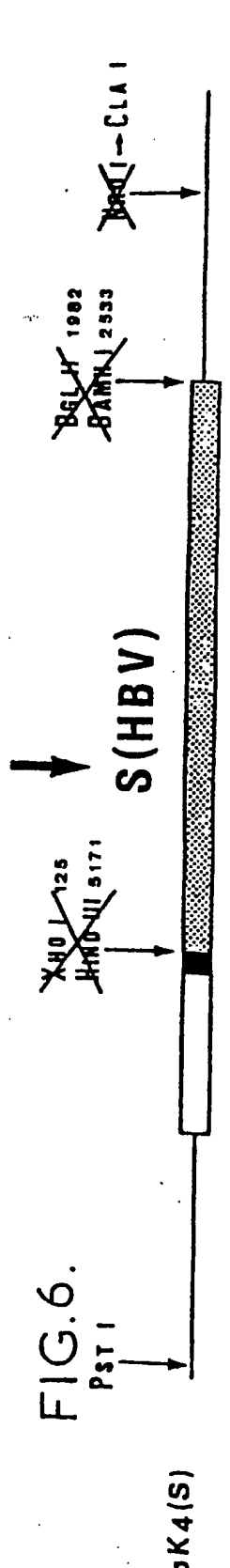
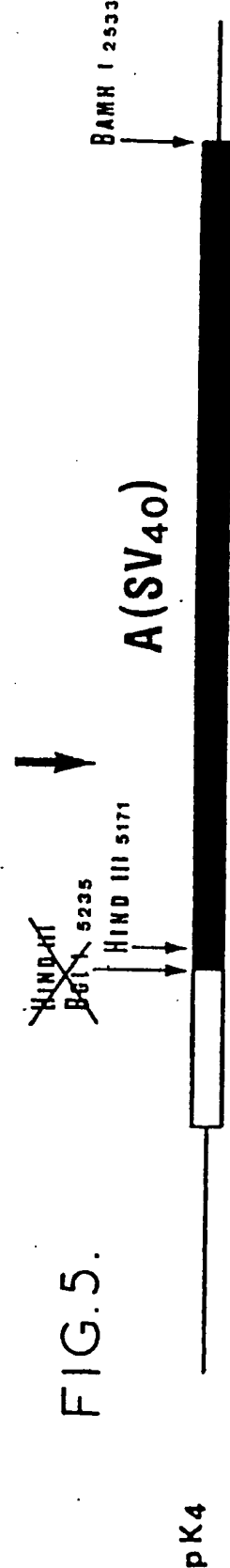
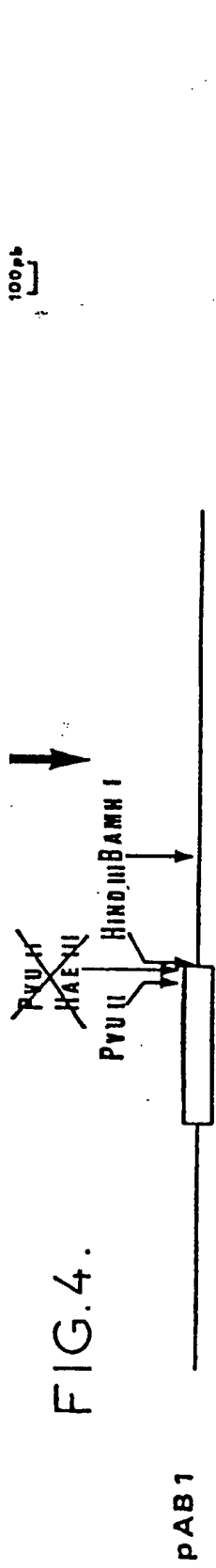
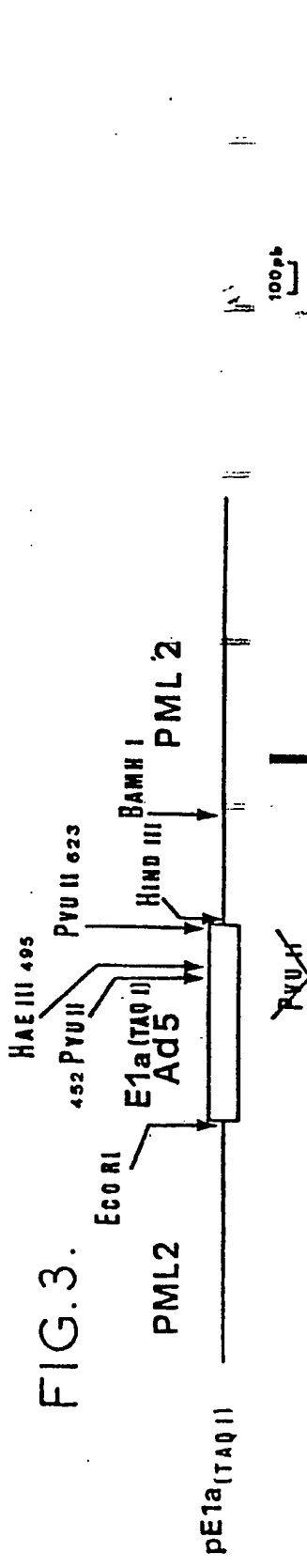


FIG.2.



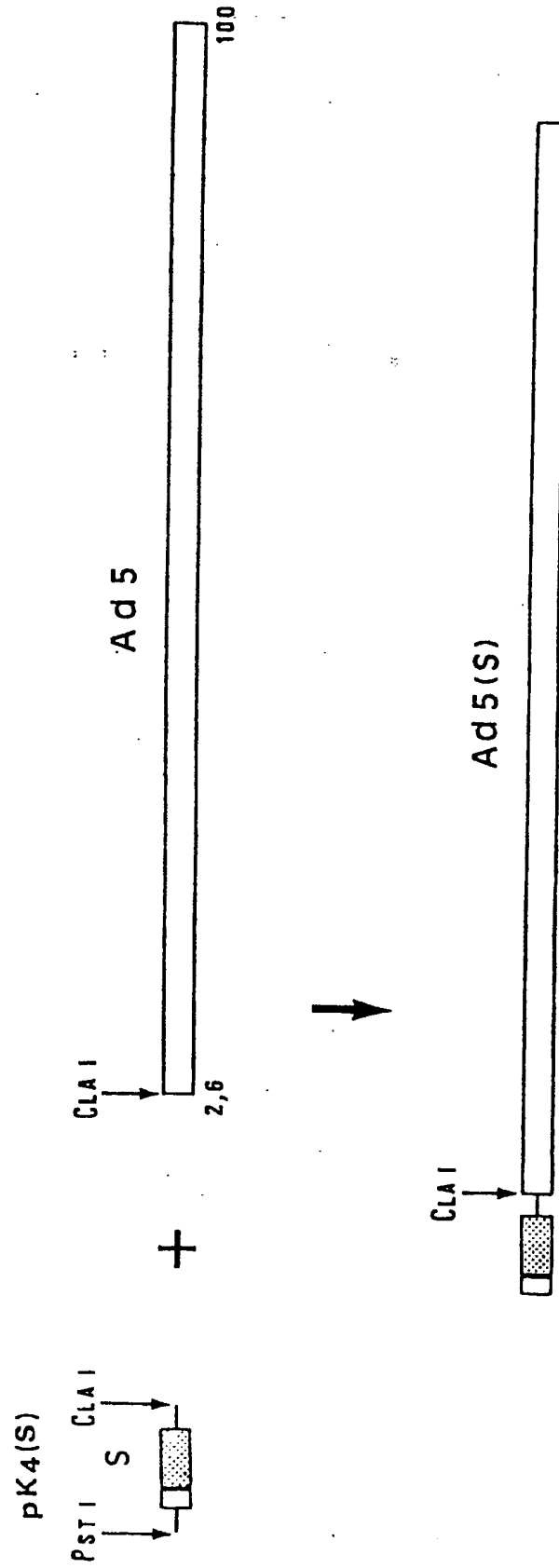


FIG. 7.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0185573

Numero de la demande

EP 85 40 2261

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
X	PROC. NATL. ACAD. SCI, vol. 80, décembre 1983, pages 7586-7590, US; I. KRUCZEK et al.: "Expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in mammalian cells under the control of adenovirus type 12 promoters: Effect of promoter methylation on gene expression" * En entier *	1, 2, 7, 9, 11	C 12 N 15/00 C 12 P 21/02 A 61 K 39/29 C 12 N 5/00
X	--- MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 3, no. 1, janvier 1983, pages 44-55, American Society for Microbiology; C.W. CROWLEY et al.: "Plasmid-directed synthesis of hepatitis B surface antigen in monkey cells" * En entier *	23	
P, X	--- PROC. NATL. ACAD. SCI, vol. 81, no. 24, décembre 1984, pages 7708-7712, Washington, US; M.-L. MICHEL et al.: "Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin" * En entier *	23	C 12 N A 61 K
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 28-02-1986	Examineur DESCAMPS J.A.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0185573

Numéro de la demande

EP 85 40 2261

Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)		
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 11, no. 24, 1983, pages 8735-8745, IRL Press Ltd, Oxford, GB; P. SASSONE-CORSI et al.: "Far upstream sequences are required for efficient transcription from the adenovirus-2 E1A transcription unit" * En entier *	1			

A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, 1982, page 123, résumé no. 63555n, Columbus, Ohio, US; A. FIRE et al.: "In vitro transcription of adenovirus"; & J. VIROL. 1981, 40(3), 703-19				

A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 102, 1985, page 158, résumé no. 18553s, Columbus, Ohio, US; J.R. NEVINS et al.: Cis and trans acting regulation of early adenovirus transcription"; & TRANSFER EXPRESSION EUKARYOTIC GENES [PROC. - SYMP.] 1983 (Pub. 1984), 239-45		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)		

A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, 1983, page 191, résumé no. 28934e, Columbus, Ohio, US; K. ODA et al.: "Expression of adenovirus type 12 E1A gene in monkey cells, using a simian virus 40 vector"; & J. VIROL. 1983, 45(1), 408-19 --- -/-				
Le present rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications					
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 28-02-1986	Examineur DESCAMPS J.A.		
<table border="0"><tr><td style="vertical-align: top;">CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</td><td style="vertical-align: top;"> T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille document correspondant</td></tr></table>				CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	 T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille document correspondant
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	 T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille document correspondant				

OE Form 1503 03 82



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0185573

Numero de la demande

EP 85 40 2261

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				Page 3
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)	
A	EP-A-0 086 707 (INSTITUT PASTEUR) * Page 12, ligne 6 *	1		
A	WO-A-8 302 393 (ANIMAL VACCINE RESEARCH CORP.)			
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)	
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications				
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 28-02-1986	Examineur DESCAMPS J.A.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES				
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire				
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)